

使用 Aunty 进行高通量蛋白质稳定性筛选

简介

在蛋白质稳定性检测中，易于使用的检测容器是该实验的关键要素。Aunty 凭借石英 96 孔板实现了高分辨率、高灵敏度和自动化功能，使其成为快速、高通量的稳定性检测平台（图 1A）。其全光谱荧光可让您选择内源的或基于染料的检测方法来确定蛋白质的熔解温度。静态和动态光散射（SLS 和 DLS）并行运行，并与荧光一起在实验的任何时间点发现聚集体。这三种方法与 Aunty 独有的石英 96 孔板配合使用，每分钟为您提供所有样品的完整蛋白质稳定性信息，并以极快的速度产生可操作的数据。

96 孔微孔板在高通量检测中任劳任怨。Aunty 的 SBS 格式 96 孔板可最大程度地提高检测通量并最大程度地减少样品消耗，每个孔仅需 8 μ L 样品（图 1B）。这些孔蚀刻在石英中，意味着无可挑剔的光学性能和与所有常见生物试剂的化学兼容性。装载样品后很方便的对板进行密封，保护您的样品免受蒸发和污染。Aunty 支持的温度范围为 15 至 95 $^{\circ}$ C，升温速率为 0.1–10 $^{\circ}$ C/分钟或将样品保持在某一温度下数小时或数天。得益于 SBS 格式的板，样品输入端口为标准的 8x12 排列规格，以及便于控制实验设置和操作的 API 端口，Aunty 的整个过程（从加载样品到运行软件）均可实现自动化。无论您如何设计实验，Aunty 都能提供无与伦比的数据分辨率，而不会牺牲实验灵活性。

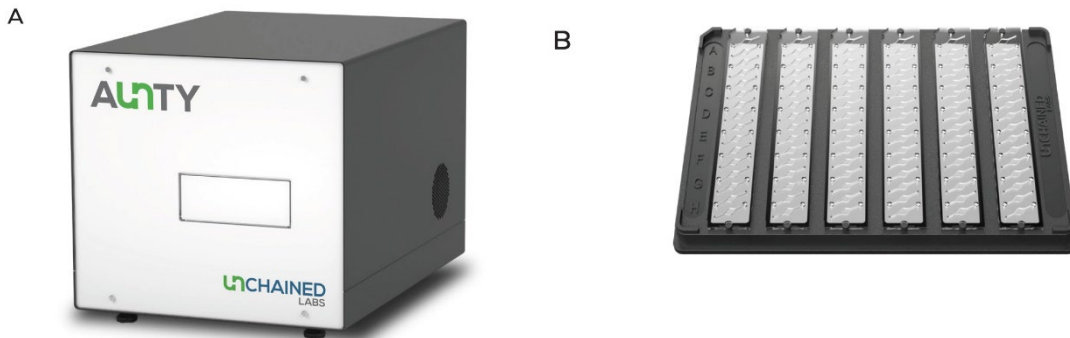


图 1：Aunty (A) 是使用 SBS 格式石英 96 孔板 (B) 的灵活、自动化友好的、适用稳定性检测的平台。

加热溶液中的蛋白质会使它们去折叠，将疏水性氨基酸如色氨酸和酪氨酸暴露在水环境中。当芳香族氨基酸从疏水性环境转变为水性环境时，它们会改变其荧光行为——通常荧光最大值会降低，而峰值移动到更高的波长（图 2）。这被称为“红移”。随温度递增跟踪这种荧光变化可以监测蛋白质的构象稳定性并确定熔解温度 (T_m)。您可以使用它对不同制剂、构建体，突变体甚至缀合物的构象稳定性进行排序。Aunty 的石英板，强大的 280 nm 激发 LED 和高灵敏度分光光度计使其具有 0.025–300 mg/mL IgG 的宽动态检测范围。全光谱荧光检测允许您检测红移或蓝移，还可以自由使用荧光染料进行差示扫描荧光测定或热位移分析。

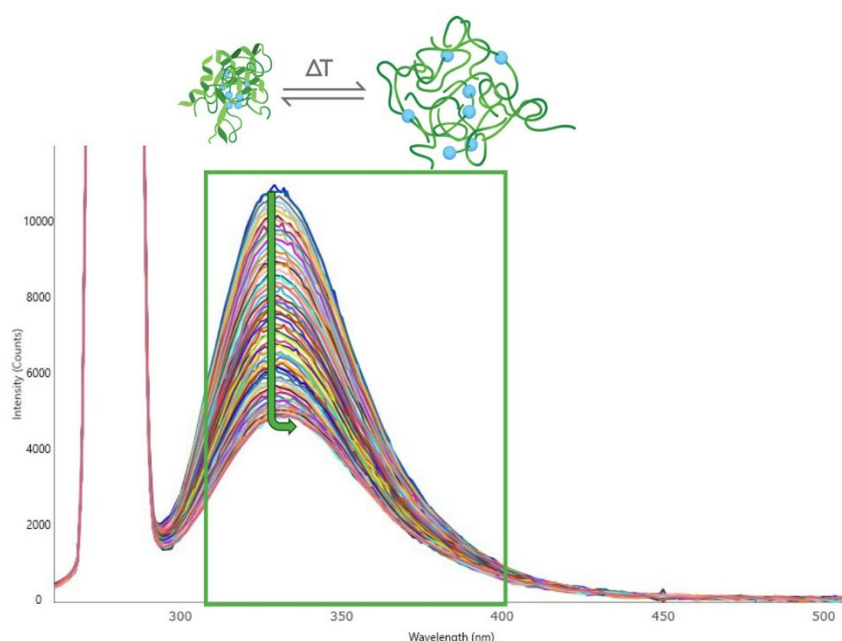


图 2：Aunty 使用 280 nm LED 激发内源蛋白质荧光。随着蛋白质因加热而展开，其内源荧光（绿色框）通常会减少并转移到更长的波长。

随着蛋白质分子的扩散，它们散射的光强会发生波动（图 3）。SLS 关注的是散射总散射光强，取决于蛋白质颗粒的分子量和浓度。另一方面，DLS 关注的是强度随时间变化的频率，有助于确定颗粒的流体动力学尺寸、z 平均直径、多分散性和溶液中颗粒大小的分布。当蛋白质聚集时，SLS 强度和 z 平均直径都会增加。Aunty 使用高灵敏度光学元件，使 SLS 的检测下限达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 IgG，使 DLS 的检测下限达到 0.1 mg/mL 的溶菌酶。

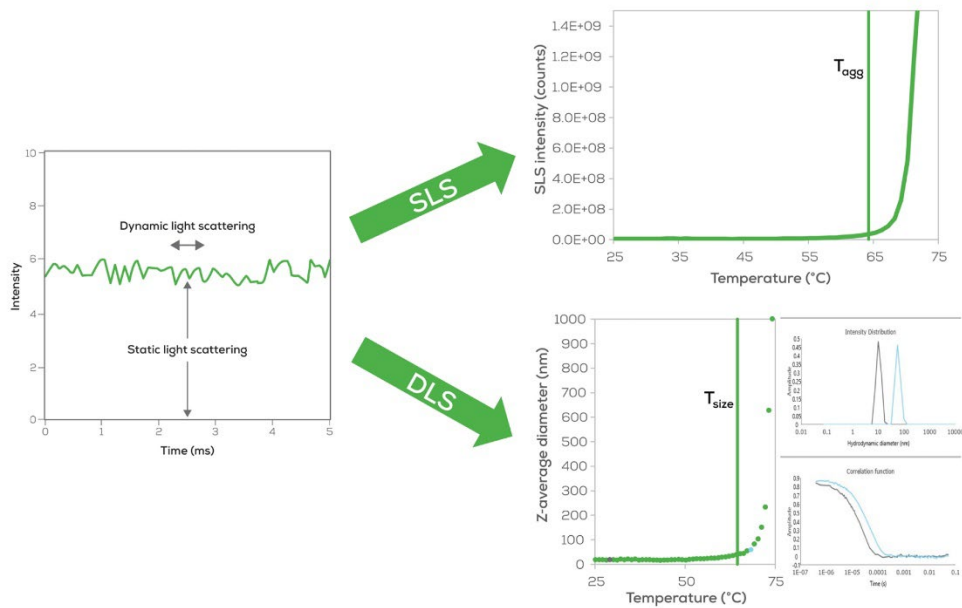


图 3：溶液中扩散粒子的光散射强度随时间的波动。SLS 是这些强度波动的平均值；DLS 观察散射光强度随时间变化的频率。Aunty 在升温实验中同时检测两者，例如，SLS 的聚集起始和 DLS 的粒子尺寸变化。

本技术说明展示了如何将荧光、SLS 和 DLS 与高质量石英 96 孔板和直观的数据分析软件相结合来进行高通量蛋白质稳定性筛选。

结果

并行检测蛋白质去折叠和聚集是缓冲液、构建体和赋形剂热稳定性筛选的关键。Aunty 在微量 96 孔板中结合荧光、SLS 和 DLS 检测，让您能够通过实验找到最佳的蛋白质配方。有时这意味着在不同的赋形剂特性之间找到正确的平衡。例如，精氨酸是一种常见的赋形剂，它限制蛋白质聚集，但也会驱动蛋白质去折叠^①。Aunty 让您评估这些因素对您感兴趣抗体的稳定性有多大影响。Aunty 检测 1 mg/mL 牛 IgG 在含有和不含 500 mM 精氨酸的 PBS 中的 T_m 与蛋白质内源荧光重心均值一阶导数峰的比较 (图 4)。添加精氨酸使 T_m 降低 3.5 °C。含有精氨酸的牛 IgG 的聚集起始温度 T_{agg} ，高于仅在 PBS 中的牛 IgG (73.4 vs 68.5 °C)。在升温过程中并行进行的 DLS 检测数据显示，在 70.2 °C 时，PBS 中 IgG 流体动力学直径比基线流体动力学直径增加了 2 倍。因此，其 T_{size} 为 70.2 °C。含有精氨酸的 IgG 的 T_{size} 为 72.7 °C。Aunty 的结果很明显：添加精氨酸会延迟这种多克隆抗体的聚集，但会加速其去折叠。叠加图表可让您更直观的比较结果，并

得出关于突变体、修改后、结合后或不同条件下稳定性的正确结论。

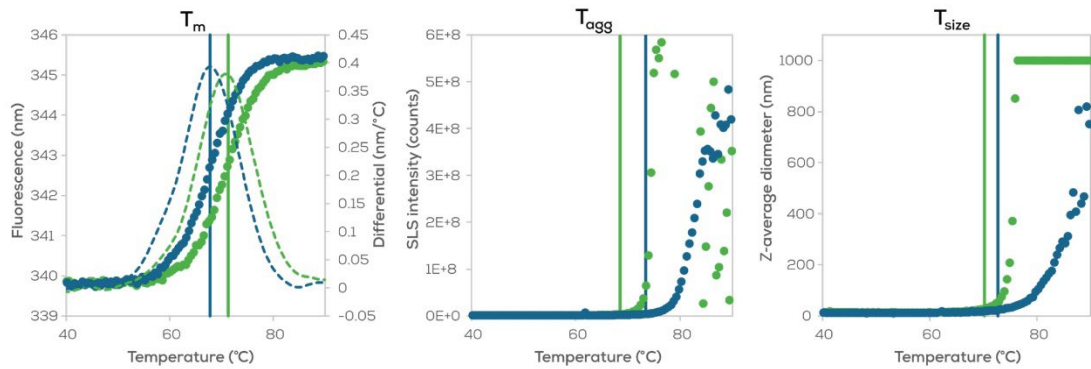


图 4: 将 PBS 中的 1 mg/mL 牛 IgG (绿色) 或含有 500 mM 精氨酸的 PBS (蓝色) 以 1 °C/分钟的速率从 25 °C 加热至 95 °C。使用 Aunty 的 T_m 和 T_{agg} (包括粒径应用程序) 每 30 秒测量一次荧光 (左)、SLS (中) 和 DLS (右)。 T_{ms} 、 T_{aggS} 和 T_{sizeS} (垂直线) 分别根据荧光差异中的峰值 (虚线) 和 SLS 强度和 z 平均直径的持续增加来分展示。图表代表三份重复。

生物制剂表征的主要目标是最大限度提高通量, 同时最大限度减少样品消耗, 但高质量的准确度和精密度同样重要。在 Aunty 上测定的 PBS 中 1 mg/mL 牛 IgG 的 96 个重复样品的 T_m 平均为 70.8 °C, CV 为 0.8% (图 5)。同时测定的 T_{agg} 平均为 67 °C, CV 为 1.1%。Aunty 展现优秀的重复性毫不费力; 其 T_m 的 $CV \leq 2\%$, 加热精度为 ± 0.1 °C。

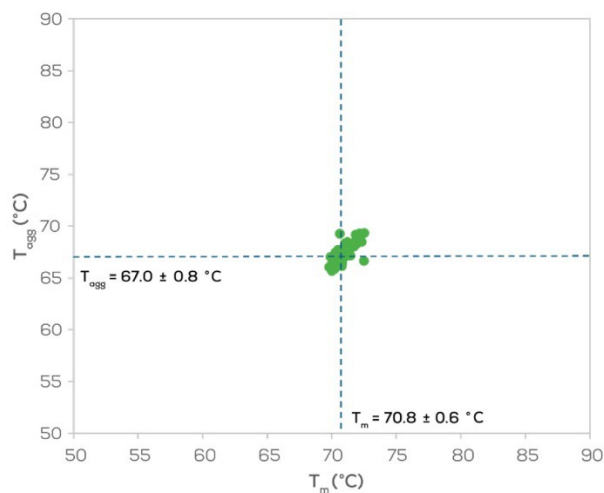


图 5: 将 96 个 1 mg/mL 牛 IgG 重复样品放入 Aunty 板中, 以 1 °C/分钟的速度从 25 °C 加热至 95 °C。使用 Aunty 的 T_m 和 T_{agg} 应用程序每分钟进行一次荧光和 SLS 测量。图中显示了每个重复样品的 T_m 和 T_{agg} 。

使用 Aunty 识别稳定的生物制剂和配方非常简单。当您使用 Aunty 的分析软件

绘制 T_m 与 T_{agg} 的图表时，您可以立即判断哪些样品具有良好的构象稳定性、胶体稳定性或两者兼而有之。您还可以看到每个样品的重复样品之间的差异，让您确信自己做出了正确的选择。

在单次 T_m & T_{agg} 实验中，以 4–8 次重复和默认设置运行了 PBS 中 1 mg/mL 抗体与各种赋形剂的 7 种组合 (图 6)。所有重复的 T_m 和 T_{agg} 的 CV 均小于 2%。不含赋形剂 (紫色) 的 PBS 中的曲妥珠单抗生物仿制药具有最高的 T_m 和 T_{agg} ，而 PBS (灰色) 中的 pembrolizumab 生物仿制药具有最低的 T_m 和 T_{agg} 。向曲妥珠单抗生物仿制药 (浅蓝色) 中添加 NaCl 对其 T_{agg} 几乎没有影响，但将其 T_m 降低了 2.6 °C。因此，NaCl 很可能是曲妥珠单抗的不合适赋形剂。然而，相对于单独 PBS 的牛 IgG 溶液 (深蓝色)，向 PBS (黄色) 中牛 IgG 添加 NaCl 不会显著改变其 T_m ，但会使其 T_{agg} 增加 2.8 °C。与曲妥珠单抗不同，NaCl 可以稳定这种牛 IgG。任何生物制剂都有自己的配方偏好，Aunty 的全石英 96 孔板使其成为极快的高通量工具，可以迅速找到生物制剂的配方偏好。

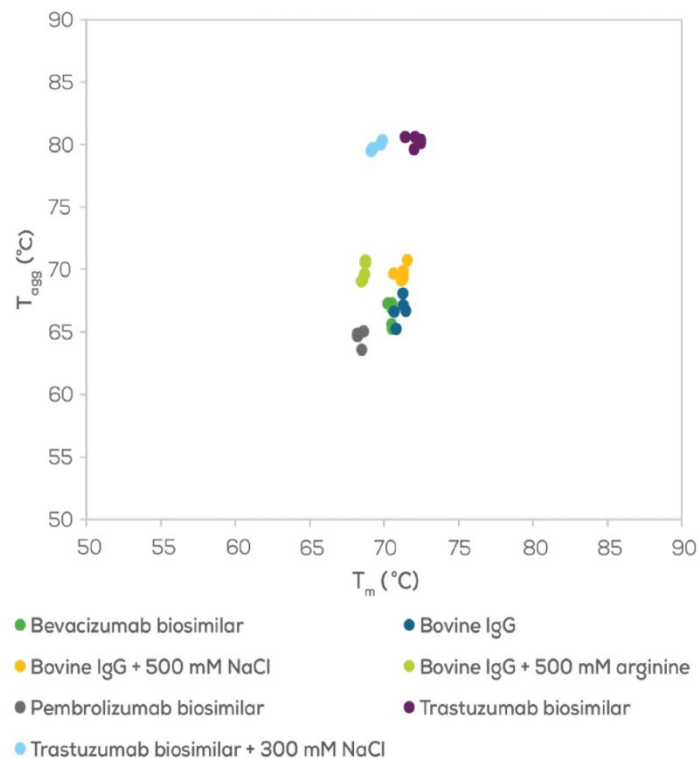


图 6: 在 25–95 °C，以 1 °C/分钟的速度加热含有激动剂的 PBS 中的 1 mg/mL 抗体。使用 Aunty 的 T_m & T_{agg} 应用程序进行荧光和 SLS 检测。图中显示了每个重复的 T_m 和 T_{agg} 。

结 论

Aunty 是蛋白质稳定性的王者，它结合了全光谱荧光、高灵敏度 SLS 和 DLS、精确的热控制和 96 孔 SBS 板。Aunty 可最大限度地提高您的检测通量，同时将样品消耗量降至每孔仅 8 μL 。快速的读取速度和前所未有的数据分辨率让您可以看到候选物的完整稳定性信息。所有 3 种检测方法都可以一起或单独运行，对一个或多个样品进行检测，因此可以根据您的需要量身定制实验。温度测量具有高度可重复性， T_m CV $\leq 2\%$ ，温度精度为 ± 0.1 $^{\circ}\text{C}$ 。通过结合 T_m 、 T_{agg} 和 T_{size} ，您将快速完成任意数量的重复，并快速识别具有最佳稳定性特征的样品，以加速可开发性和配方筛选。所有这些都缩短了将新型、拯救生命的疗法带入临床所需的时间。

参考文献

1. Protein–excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. TJ Kamerzell, et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011; 63(13):1118–1159.



Unchained Labs
4747 Willow Road
Pleasanton, CA 94588
Phone: 1.925.587.9800
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2025 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo and Aunty are registered trademarks and registered trademark of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A